

YEp13 vector를 이용한 *Bacillus amyloliquefaciens* amylase gene의 cloning

II. *Saccharomyces cerevisiae*에서의 發現

김관필* · 서정훈

*경북대학교 대학원
경북대학교 자연과학대학 미생물학과
(1986년 1월 30일 수리)

Cloning of *Bacillus amyloliquefaciens* amylase gene using YEp13 as a vector

II. Expression of cloned amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*

Goan Pil Kim* and Jung Hwn Seu

*Graduate School, Kyungpook National University
Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu, Korea
(Received January 30, 1986)

α -Amylase gene of *Bacillus amyloliquefaciens* was cloned on plasmid YEp13, *S. cerevisiae*-*E. coli* shuttle vector. Hybrid plasmid pTG17, carrying α -amylase gene of *B. amyloliquefaciens*, was transformed to *E. coli* and the expression of it in yeast was investigated. This plasmid was unstable in *E. coli* and produced two minor plasmids, pTG17-1 and pTG17-2, which resulted from the segregation of it. Transformant of *S. cerevisiae* MC16 with pTG17-1 plasmid was not appeared on SD medium because of the Leu2 gene defection. *S. cerevisiae* could be transformed by the hybrid plasmid, and α -amylase activity of the yeast transformant was detected by Somogyi-Nelson method and agar diffusion method.

현재 유전자조작의 새로운 기술중의 하나인 vector를 통한 gene cloning은 유전정보의 삽입 또는 변형, 분비에 관한 기술 및 DNA sequencing^(1,2), 유전자 합성등의 방법⁽³⁾에 대한 많은 연구가 되고 있다. 이와 같은 gene cloning기술로서 세포의 분비성 효소의 일종인 amylase의 생성균주인 *B. subtilis*⁽⁴⁾, *B. stearothermophilus*⁽⁵⁾ 및 *B. amyloliquefaciens*^(6,7)의 α -amylase 유전자를 vector에 실어서 효소의 대량생산, 효소생성 및 유전자 역할 규명에 관한 연구를 행하고 있다. 즉, *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase 분자량은 54,778이고, Takkinen등에 의해 그 일차구조가 완전히 해명되었으며⁽⁷⁾, α -amylase 유전자가 cloning되어 *E. coli* 내에서 형질발현된 것이 보고된 바 있다. *E. coli*를 사용하여 vector pl-

asmid의 항생제 내성용 marker로 하여 cloned gene을 선별하였으며, 또한 plasmid가 yeast-bacteria shuttle vector인 YEp, YRp, YIp^(8,9) 경우 이 cloned gene을 효도에 형질전환시킬 수 있다. 그래서 본 실험에서는 alcohol 발효능과 전분액화능을 동시에 지니는 *S. cerevisiae* 균주개발을 목적으로 YEp 13 plasmid를 이용하여 액화형 amylase인 *B. amyloliquefaciens*⁽⁷⁾의 α -amylase gene을 cloning시켜 *E. coli* C600에서 α -amylase 형질발현이 확인된 형질 전환체에서 각각의 plasmid DNA를 분리하여 band의 특성과 제한효소로서 physical map 작성을 시도했고 이 cloned plasmid를 *S. cerevisiae* MC 16에 형질전환시켜서 amylase 생성능을 확인하였다.

Table 1. List of Strains.

Strains	Genotype
<i>E. coli</i> C 600	F ⁻ , thi-1, thr-1, leu B 6, lacY1, tonA21, supE44.
<i>S. cerevisiae</i> MC 16	α , leu2 ⁻ , lys ⁻ , his ⁻ , ade ⁻
<i>B. amyloliquefaciens</i>	wild type, amy. ⁺

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 균주는 Table 1 과 같다.

배지

LB배지⁽¹⁰⁾는 Tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, Glucose 1g을 증류수에 녹여 최종 1000 ml가 되게 하여 사용하였으며, 필요에 따라 이 배지에 ampicillin (50 μ g/ml) 혹은 tetracycline (20 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다. 또한 SD 배지는 Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acids 4g, glucose 12g, agar 12g을 증류수에 녹여 1,000ml 되게 하였으며 YPD배지⁽¹¹⁾는 yeast-extract 10g, polypeptone 20g, glucose 20g을 증류수 1000 ml에 녹여 사용하였다.

DNA의 분리 및 정제

Vector plasmid는 ampicillin (30 μ g/ml)을 함유한 LB배지에서 12시간 진탕배양한후 Birnboim 등의 방법⁽¹²⁾으로 추출한 다음 electroelution 방법으로 CCC plasmid band를 얻었으며, *B. amyloliquefaciens*의 chromosomal DNA는 LB배지상에서 12시간 진탕배양한 후 Miura 등의 방법으로 분리하였다.

E. coli transformation 방법

*E. coli*를 LB 배지에서 초기 대수 증식기까지 증식시킨 후 Sadai와 Kada의 방법⁽¹³⁾으로 형질전환시켰다.

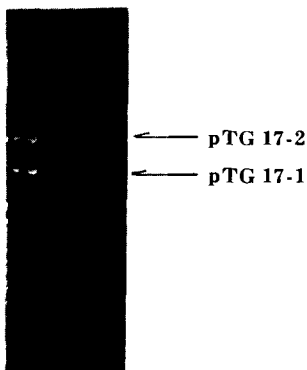


Fig. 1. Electrophoresis diagram of recombinant plasmid TG 17.

α -amylase 활성 측정

Amylase의 activity 측정은 가용성 전분을 기질로 하여 1 보에 준하였다⁽¹⁶⁾.

Yeast transformation 방법

YPD 배지⁽¹¹⁾에서 26시간 동안 배양한 *S. cerevisiae* MC-16 균주를 원심분리, 집균하여 Hinnen 방법⁽¹⁴⁾으로 spheroplast를 형성시킨 후 plasmid DNA를 혼합하여 형질전환시켰다.

Yeast에서의 plasmid 추출 방법

효모균주를 SD 배지⁽¹¹⁾에서 3일 동안 진탕배양한 후 Devenish 방법⁽¹⁵⁾에 의해서 plasmid DNA를 추출하였다.

결과 및 고찰

Amylase gene이 hybrid된 YEp13 plasmid의 선별

1 보에서 YEp 13 vector plasmid에 *Bacillus amyloliquefaciens*의 α -amylase gene을 cloning 시켜 얻은 hybrid DNA를 *E. coli* C 600에 transformation 시킨 바 이 hybrid plasmid는 세균세포 내에서 매우 불안정하여 여러개의 DNA fragment로 segregation 됨으로, 그 중 가장 amylase 생성능이 높고 DNA band가 단순하며 또 yeast내에서 amylase 생성이 확인되는 TG 17 strain 한주를 선별하였다.

TG 17 균주로부터 plasmid의 분리

YEp 13 hybrid plasmid를 *E. coli* C 600에 형질전환하여 얻은 TG 17 균주의 plasmid band는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 2개의 plasmid band가 확인되었으며 이 외에 chromosomal DNA로 인정되는 2개의 band가 확인되었다. 여기에서 나타나는 2개의 plasmid band는 Meyer 등의 방법으로 electroelution하여 DNA size가 적은 것을 pTG 17-1 또 size가 큰 것을 pTG 17-2로 구분하였다.

pTG 17-1, pTG 17-2 plasmid의 형질발현

각각의 분리한 pTG 17-1과 pTG 17-2 plasmid의 특성을 알아보기 위해서 *E. coli* HB 101와 *S. cerevisiae* MC 16에 transformation 시켜서 형질발현을 유도해 보았다.

Table 2에서 보는 바와 같이 pTG 17-1 plasmid

Table 2. Characteristic of recombinant plasmid pTG 17-1 and pTG 17-2.

Plasmid	Antibiotic resistance marker	Amylase	Replication host cell
pTG 17-1	Ap ^R , Tc ^S	+	<i>E. coli</i>
pTG 17-2	Ap ^S , Tc ^S	+	<i>S. cerevisiae</i>

Ap^R; Ampicillin resistance, Ap^S; Ampicillin sensitive. Tc^S; Tetracycline sensitive.



Fig. 2. Agarose gel electropherogram of plasmid pTG 17-2 and digested plasmid pTG 17-2 DNA band.

(1) lane : λ DNA (Hind III). (2) lane : pTG 17-2 (Pst I). (3) lane : pTG 17-2. (4) lane : pTG 17-2 (EcoRI). (5) lane : λ DNA (Hind III).

는 *E. coli* HB 101에 형질전환 되어 Ap^R , Tc^S , Amylase*로 나타났으며, pTG 17-2는 *E. coli* 내에서 형질전환체를 확인할 수 없었으나 Leu 2 영양요구주인 *S. cerevisiae* MC 16에 형질전환되어 Leu 2 gene이 발현되는 것과 동시에 amylase 생성도 확인되었다. 그러므로 이들 두 plasmid는 YEp 13 hybrid plasmid가 *E. coli* 내에서 각각 amylase gene을 가지는 상태에서 segregation이 되었음이 확인되었다.

pTG 17-2 plasmid의 restriction

YEp 13 hybrid DNA가 *E. coli* 내에서 segregation되어서 새로이 생성된 segregant pTG 17-1 및 pTG 17-2는 각각 *B. amyloliquefaciens*의 amylase gene을 가지고 있으나 YEp 13 vector 부분의 존재하는 부위가 달라서 각각의 plasmid의 성질이 다르다. 이들 두 plasmid 중에서 원래의 연구목적에 부합하는 성질 즉 효모에 형질전환되어 amylase를 생성하는 pTG 17-2 plasmid를 선택하여 이 plasmid를 제한효소인 Pst I과 Eco RI으로 처리하여 plasmid의 size를 조사하였다. EcoRI에 의한 digestion fragment는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 7.3 kb, 4.8kb 및 2.4 kb의 3개의 band가 확인되었으며 이들 세 fragment로 구성된 plasmid size는 약 14.5kb로 나타났다으며 Pst I에 의해서는 단일의 linear fragment만 생겼으며 size는 약 14 kb로 측정되었다. Vector

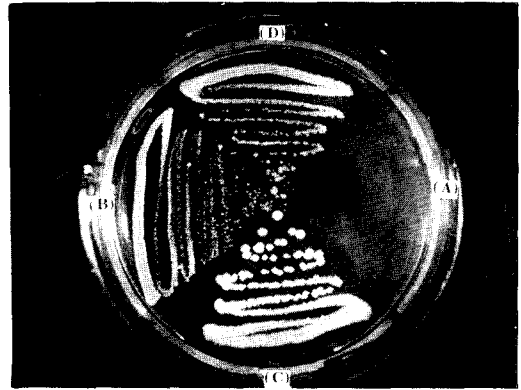


Fig. 3. Growth of *S. cerevisiae* transformant on SD medium.

Well (A) : *S. cerevisiae* MC 16 (recipient cell)
 (B) : *S. cerevisiae* TG 17-2-1
 (C) : *S. cerevisiae* TG 17-2-2
 (D) : *S. cerevisiae* TG 17-2-3

plasmid인 YEp 13의 DNA size는 10.7 kb이며, Palva등에 의하면 *B. amyloliquefaciens*의 chromosomal DNA를 Sau 3 AI로 부분분획을 하였을 시 amylase gene size는 2.3 kb이므로, 이들 두 DNA의 hybrid는 약 13 kb가 된다. 그러나 여기에서 얻은 pTG 17-2 plasmid의 size는 최소로 보아도 약 14 kb이며 또 여기에서 Ap^R site가 이탈된 상태이므로 pTG 17-2에 insertion 된 amylase gene size는 3kb 이상으로 추측되었으며 이 segregant의 restriction analysis는 불가능하였다.

pTG 17-2 plasmid의 yeast에서의 형질전환

S. cerevisiae MC 16을 host cell로 하여 pTG 17-2 plasmid를 형질전환 하였으며 형질전환체의 확인을 Leu 2 marker로서 확인하였다 (Fig. 3).

형질전환체로 부터의 amylase 확인

pTG 17-2 plasmid로 형질전환한 *S. cerevisiae* 세포를 histidine, adenine, lysine을 각각 50 μ g/ml의 농도가 되게 첨가한 SD배지에서 48시간 진탕배양한 후 yeast 균체를 원심집중하여 0.1M citrate phosphate buffer (pH 6.5)에 현탁하고 5분간 so-

Table 3. Amylase production of *S. cerevisiae* transformants.

Recipient	<i>S. cerevisiae</i> MC 16	- (unit)
Transformant	<i>S. cerevisiae</i> TG 17-2-1	20
	<i>S. cerevisiae</i> TG 17-2-2	16
	<i>S. cerevisiae</i> TG 17-2-3	18.4

1 unit; Amount of enzyme which released 1 μ g/ml of reducing sugar per hour.

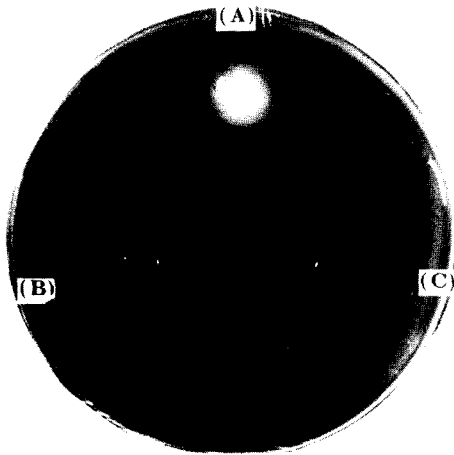


Fig. 4. Amylase detection with agar diffusion method.

Well (A) : *S. cerevisiae* TG 17-2-1
(B, C) : *S. cerevisiae* MC-16

nication한 다음, 그 원심분리 상등액을 효소액으로 하여 amylase활성을 재료 및 방법에 준하여 측정하였으며 이의 결과는 Table 3과 같다.

또한 효소액을 0.8% starch gel 상에서 agar diffusion 방법으로 host인 *S. cerevisiae* MC16과 transformant인 *S. cerevisiae* TG 17-2-1과 비교하였다. 이때 host에서는 환을 형성하지 못하였으나 transformant에서는 무색환을 형성하였다.

요 약

YEpl3 plasmid에 *B. amyloliquefaciens*의 α -amylase gene을 cloning시켜서 얻은 hybrid plasmid를 *E. coli* C 600으로 형질전환시켜서 amylase 활성을 나타내는 균주를 선별하였다. 선별된 *E. coli* C 600 균주를 plasmid 추출하여 전기영동해 본 결과 plasmid가 매우 불안정하였으며, 그중 가장 단순한 plasmid band을 지니고 있으며 amylase 활성이 강한 *E. coli* 균주를 선별하였다. 선별된 균주의 균체내에 있는 2개의 plasmid DNA를 분리하여 각각의 plasmid를 pTG 17-1, pTG 17-2로 명명하였으며 *S. cerevisiae* MC 16에서 형질전환이 가능한 pTG 17-2 DNA를 제한효소 EcoRI 과 Pst I 으로 restriction한 결과 EcoRI으로 처리한 경우는 7.3, 4.8, 2.4 kb인 3개의 분획으로 나타났으며 Pst I 으로 처리한 경우는 linear로 14.5 kb임을 알았으며 이로써 pTG 17-2 plasmid의 size가 약 14 kb임을 알았다.

또한 *E. coli* 균체내에서의 ampicillin sensitive 로

써 이 plasmid의 ampicillin resistance site가 결실되었음을 알았고 효모의 형질전환체로부터의 α -amylase는 균체외로 분비되지 않았고 효모균체내의 α -amylase는 Somogyi-Nelson 방법과 Agar diffusion 방법으로 확인하였다.

사 사

본 연구는 1984년도 한국과학재단 차관연구비 (amylase 유전자를 cloning한 효모분비 vector의 개발 및 응용)에 의해서 수행된 연구의 일부이며 관계하신 여러분께 깊은 감사를 드리는 바입니다.

참고문헌

1. Southern, E. M.: *Jour. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975).
2. Wahl, G. M., M. Stern and G. R. Stark: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 3683 (1979).
3. Itakura, K. and A. D. Riggs: *Science*, **209**, 1041 (1980).
4. Yamazaki, H., K. Ohmura, A. Nakayama and Y. Takeichi: *J. Bacteriol.*, **156**, 327 (1983).
5. Ysukagoshi, N., H. Ihara, H. Yamagata and S. Udaka: *Mol. Gen. Genet.*, **193**, 58 (1983).
6. Palva, I.: *Gene*, **19**, 81 (1982).
7. Takkinen, K., R. F. Pettersson, N. Kalkkinen, I. Palva, H. Soderlund and L. Kaariainen: *J. Biol. Chem.*, **258**, 1007 (1983).
8. Struhl, K., D. T. Stinchcomb, S. Scherer and R. W. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 1035 (1979).
9. Scott, J. F.: Basic Life Sciences. (Hollaender, A., ed.) Plenum, New York, Vol. **19**, 75 (1982).
10. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1st ed., (1982).
11. Sherman, F., G. R. Fink and J. B. Hicks: *Method in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1st ed., (1982).
12. Birnboim, H. C. and J. Doly: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513 (1979).
13. Sadai, Y. and T. Kada: *J. Bacteriol.*, **153**, 813 (1983).
14. Hinnen, A. and J. B. Hicks and G. R. Fink: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75** (4), 1929 (1978).
15. Devenish, A., J. B. Hicks and G. R. Fink: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75** (4), 1929 (1978).
16. Ando, E., H. Terayama, K. Nisizawa and T. Yamakawa: *Biochemical Research Method*, Asakura press, Tokyo, Vol. 1, 126 (1967).
17. Andreadis, A., Y. P. Hsu, M. Hermodson, G. Kohlhaw and P. Schimmel: *J. Biol. Chem.*, **259** (13), 8059 (1984).